

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年10月24日 (24.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/083149 A1

- (51) 国際特許分類:
A61P 25/00, 25/28, 43/00 A61K 31/661,
- (21) 国際出願番号:
PCT/JP02/03659
- (22) 国際出願日:
2002年4月12日 (12.04.2002)
- (25) 国際出願の言語:
日本語
- (26) 国際公開の言語:
日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-115999 2001年4月13日 (13.04.2001) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ジェンコム (GENCOM CORPORATION) [JP/JP]; 〒
194-8511 東京都町田市南大谷11号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 室伏 きみ子 (MUROFUSHI,Kimiko) [JP/JP]; 〒 336-0026 埼
- 玉県 さいたま市辻 4-12-17 Saitama (JP). 阿相 皓晃 (ASOU,Hiroaki) [JP/JP]; 〒 202-0013 東京都都西東京市中町 1-11-28 Tokyo (JP). 小林 哲幸 (KOBAYASHI,Tetsuyuki) [JP/JP]; 〒 174-0052 東京都板橋区蓮沼町 63-4 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒 104-0031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): US.
- (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 國際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: DRUGS FOR PROMOTING THE PROLIFERATION, DIFFERENTIATION AND/OR SURVIVAL OF GLIAL CELLS CONTAINING CYCLIC PHOSPHATIDIC ACID

(54) 発明の名称: 環状ホスファチジン酸を含むグリア細胞の増殖、分化及び/又は生存の促進のための薬剤

(57) Abstract: It is intended to clarify a novel physiological activity of cPA on glial cells to thereby disclose its possibility as a remedy for brain nerve disorders such as Alzheimer's disease, ischemic nerve disorders and Parkinson's disease (in particular, cerebrovascular dementia such as Binswanger's dementia). Namely, remedies for cerebrovascular dementia which contain as the active ingredient a cyclic phosphatidic acid derivative having a cyclic phosphate structure at the glycerol sn-2- and 3-positions

(57) 要約:

本発明の目的は、cPA の新しい生理活性として、グリア細胞への作用を解明し、アルツハイマー病、虚血時の神経障害、パーキンソン病などの脳神経障害、特に、Binswanger型痴呆などの脳血管性痴呆の治療薬としての可能性を明らかにすることである。本発明によれば、本発明によれば、グリセロール sn-2 位、3 位の環状リン酸構造を有する環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む脳血管性痴呆治療剤が提供される。

WO 02/083149 A1

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

明細書

環状ホスファチジン酸を含むグリア細胞の増殖、 分化及び／又は生存の促進のための薬剤

技術分野

本発明は、リゾリン脂質の1種である環状ホスファチジン酸誘導体を含む薬剤に関する。より詳細には、本発明は、グリア細胞への作用を有する環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含むグリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤、並びにグリア細胞の減少を伴なう神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤に関する。

背景技術

生体膜を構成している主成分であるグリセロリン脂質は、一般にグリセロール骨格に疎水性の脂肪酸が2分子結合し、さらにリン酸基を介してコリンやエタノールアミンなどの親水性基が結合している。リン脂質における疎水性部分と親水性部分とのバランスが、安定な脂質二重層を形成する上では重要である。これに対してリゾリン脂質は、脂肪酸が1分子のみ結合したものであり、疎水性部分が親水性基に対して相対的に小さくなるため、安定な膜構造をとれず、逆にそれを壊す界面活性作用を示す。

しかし、近年、低濃度で特有の生理活性を示すリゾリン脂質が多数見つかっており、そのうちの一つとしてリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)が挙げられる。LPAは最も単純な構造を持つリン脂質の一つであり、グリセロールのsn-1位あるいは2位の脂肪酸のどちらか一方が脱アシル化されている点でホスファチジン酸(phosphatidic acid; PA)とは相違する(図1を参照)。

LPAは、生体内にごく微量(細胞全リン脂質中の0.5%以下)しか存在しない。従来、LPAはリン脂質生合成の中間産物又は分解中間物と考えられていた。しかし、1970年代後半に、血漿中(Schumacher, K.A., 他, Thromb. Haemostas., 42,

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

631-640(1979)) やダイズ粗レシチン画分中 (Tokumura, A., 他, *Lipids*, 13, 468-472(1978)) に存在する血管収縮作用を示す物質が LPA であると同定された。更に、血清中の脂質性増殖因子が LPA であることも示され (van Corven, E., 他, *Cell* 59, 45-54(1989))、LPA は生理活性脂質として注目されるようになった。

LPA には、細胞増殖促進作用 (Fischer D. J., 他, *Mol Pharmacol*, 54, 979-988 (1988))、癌細胞の浸潤促進 (Imamura, F., 他 : *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 493-496(1991) ; Imamura, F., 他 : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193, 497-503(1993) ; 及び Imamura, F., 他 : *Int. J. Cancer*, 65, 627-632(1996))、アポトーシスの抑制 (Umnaky, S. R., 他 : *Cell Death Diff.*, 4, 608-616(1997))などを含む多様な生理活性のあることが今までに明らかにされている。特に、神経細胞に対しても、LPA は神経突起の退縮を引き起こすことが知られている (Tigyi, G., 他 : *J. Biol. Chem.*, 267, 21360-21367(1992) ; Jalink, K., 他 : *Cell Growth & Differ.*, 4, 247-255(1994) ; Jalink, K., 他 : *J. Cell Biol.*, 126, 801-810(1994) ; 及び Tigyi, G., 他 : *J. Neurochem.*, 66, 537-548(1996))。また、神経系株化細胞である PC12 細胞では開口放出を誘導することも報告されている (Shiono, S., 他 : *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 193, 663-667(1993))。さらに、1996 年に Chun らによって神経上皮細胞層 (ventricular zone, vz) に特異的に発現する G タンパク質関連受容体遺伝子 (ventricular zone gene-1; vwg-1/edg-2) がクローニングされ、当該遺伝子を過剰発現させた細胞の形態変化に血清中の脂質が必要であるという知見から、その特異的リガンドが LPA であることが明らかにされた (Hecht, J. H., 他 : *J. Cell Biol.*, 135, 1071-1083(1996))。これらの知見は、神経系における LPA シグナリングの重要性を示唆しており、神経の発生や分化において LPA が重要な役割を演じていると考えられる。

一方、本発明者らは、以前より真性粘菌 *Physarum polycephalum* を実験材料として、様々な細胞生化学的解析を行っている。真性粘菌は、外部環境の変化に応じて、形態変化を示し、その増殖・分化に伴って、生体膜脂質の組成と代謝に著しい変化を見せることが明らかにされてきた。1992 年に単相体ミクソアーベか

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

ら単離・同定された新規の脂質成分は、構造解析の結果、グリセロール骨格の sn-1 位にシクロプロパン環を含むヘキサデカン酸を持ち、sn-2 位と 3 位にリン酸が環状にエステル結合をしている物質であると確認された (Murakami-Murofushi, K., 他: *J. Biol. Chem.*, 267, 21512-21517(1992))。この物質は、*Physarum* 由来の LPA 類似体であることから、PHYLPA と命名された (図 2 を参照)。

PHYLPA は、真核細胞の DNA ポリメラーゼ α の活性を抑え、動物培養細胞の増殖を抑制した脂質画分より得られたものであり、PHYLPA がこれらの生理活性を示すことが確認されている。PHYLPA は特徴的な脂肪酸を有しているが、この脂肪酸部分を別の一般的な脂肪酸に置換した構造類似体を有機合成し、それらの生理活性を調べた結果、PHYLPA と同様の生理作用が示された (Murakami-Murofushi, K., 他: *Biochem. Biophys. Acta*, 1258, 57-60(1995))。このことより、これらの生理作用に重要な構造はグリセロール sn-2 位、3 位の環状リン酸構造にあると推測される。この構造を持つ脂質は、総称して環状ホスファチジン酸 (cyclic phosphatidic acid; cPA) と称される (図 2 を参照)。

cPA は真性粘菌特有の脂質ではなく、広く生物界に存在していることが確認された。例えば、ヒト血清アルブミン結合脂質より、脂肪酸部分にパルミチン酸 (C16:0) を有する cPA が単離・同定され、ミリスチン酸 (C14:0) 及びステアリン酸 (C18:0) が結合した cPA も少量存在することが示唆された。血清中の cPA の濃度は約 $10^{-7} M$ と予想され、これは LPA の血清中濃度の約 1/10 に相当する (Kobayashi, T., 他: *Life Science*, 65, 2185-2191(1999))。その後、LPA と同様にヒト血清中やウサギ涙腺液中にも cPA が存在することが確認された (Liliom, K., 他: *Am. J. Physiol.*, 274, C1065-1074(1998))。

cPA の作用についても、LPA と相反又は類似する生理活性を示すことが報告されている。例えば、細胞増殖の抑制 (Murakami-Murofushi, K., 他: *Cell Struct. Funct.*, 18, 363-370(1993))、癌細胞の浸潤抑制 (Mukai, M. 他: *Int. J. Cancer*, 81, 918-922, 1999)、および細胞内ストレスファイバーの形成 (Fischer, D. J., 他: *Mol. Pharmacol.*, 54, 979-988(1998)) などが報告されている。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

ところで、加齢に伴うグリア細胞の老化及び機能低下は老人痴呆と密接な関係がある。さらに、最近の知見によれば、年老いた脳では、ニューロンよりも、グリア細胞が著しく減少しており、特にミエリンが損傷、減少しているということが分かってきた。日本で多く見られる脳血管性痴呆である、ビンスワンガー型痴呆では、脳血流が低下して、白質のミエリン鞘が最初にダメージを受けることもわかっている。しかしながら、cPA がグリア細胞に及ぼす作用についてはこれまで報告がなされていない。

発明の開示

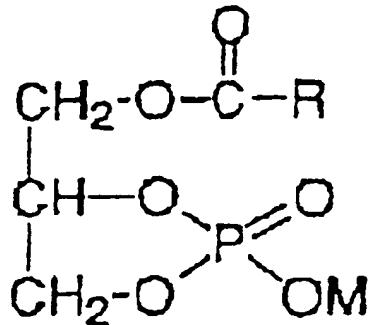
本発明は、cPA の新しい生理活性の一つとしてグリア細胞への作用を解明し、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進を図ることによってグリア細胞の減少を伴なう神経疾患の治療及び／又は予防に有用な新規な薬剤を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決するために銳意検討した結果、cPA がミエリン形成に主要な役割を担っているオリゴデンドロサイトの増殖及び生存（サバイバル）を促進すること、並びに、cPA がオリゴデンドロサイトに栄養を供給するアストロサイトの生存を促進することによってオリゴデンドロサイトの生存促進に寄与していることを明らかにした。本発明者らはこれらの知見に基づき、cPA がグリア細胞の減少を伴なう神経疾患（例えば、ビンスワンガー型痴呆などの脳血管性痴呆など）の治療及び／又は予防のための薬剤となり得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、一般式(I)：

WO 02/083149

PCT/JP02/03659



(式中、Rは、炭素数1~30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤が提供される。

グリア細胞は好ましくは、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞、アストロサイトまたはミクログリアから選択される細胞であり、特に好ましくは、オリゴデンドロサイト又はアストロサイトから選択される細胞である。

本発明の別の側面によれば、上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、グリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤が提供される。

グリア細胞の減少を伴なう神経疾患は、例えば、脳血管性痴呆であり、その具体例としては、ビンスワンガー型痴呆が挙げられる。

一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体は特に好ましくは、1-オレオイル環状ホスファチジン酸である。

本発明のさらに別の側面によれば、

治療的有効量の上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存を促進する方法；並びに、

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

治療的有効量の上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、グリア細胞の減少に起因する神経疾患を治療及び／又は予防する方法；
が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、

上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体の、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存のための薬剤の製造における使用；並びに、

上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体の、グリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤の製造における使用；
が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、ホスファチジン酸(PA)とリゾホスファチジン酸(LPA)の構造を示す図である。

図2は、リソリン脂質の構造を示す図である。Aは1-アシルLPA、BはPHYLPA、Cは1-アシルcPAを示す。

図3は、脳神経細胞の種類とその役割を説明する図である。

図4は、グリア細胞の分化を説明する図である。

図5は、オリゴデンドロサイトの分化段階によって発現される種々の特異的タンパク質を説明する図である。

図6は、オリゴデンドロサイトの初代培養の概要と経過に伴う細胞を示す。

図7は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による培養開始6日目における細胞を示す。

図8は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第1回継代後6日目の細胞を示す。

図9は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第2回継代後6日目の細胞を示す。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図10は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第2回継代後6日目の細胞を染色したものである。

図11は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第3回継代後6日目(3P-OL)の細胞を示す。

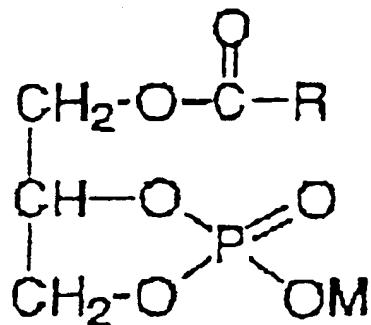
図12は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第3回継代後6日目(3P-OL)の細胞を染色したものである。

図13は、3P-OL到達からさらに10日後の細胞を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の薬剤は、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進、並びにグリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のために使用することができ、下記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む。



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

一般式(I)において、置換基Rが示す炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ペンタデシル基、オクタデシル基などが挙げられる。

置換基Rが示す炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、8-デセニル基、8-ウンデセニル基、8-ドデセニル基、8-トリデセニル基、8-テトラデセニル基、8-ペンタデセニル基、8-ヘキサデセニル基、8-ヘプタデセニル基、8-オクタデセニル基、8-イコセニル基、8-ドコセニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジエニル基、ヘプタデカ-8, 11, 14-トリエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13-テトラエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13, 16-ペンタエニル基、ヘニコサ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサエニル基などが挙げられる。

置換基Rが示す炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、8-デシニル基、8-ウンデシニル基、8-ドデシニル基、8-トリデシニル基、8-テトラデシニル基、8-ペンタデシニル基、8-ヘキサデシニル基、8-ヘプタデシニル基、8-オクタデシニル基、8-イコシニル基、8-ドコシニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジイニル基などが挙げられる。

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルプロピジン環などが挙げられる。

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシリエチル基、8, 9-メタノペンタデシル基などが挙げられる。

置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ペンジル基、フェネチル基、p-ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸(cPA)誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。

本発明で用いられる一般式(I)で示されるcPAの具体例としては、オレオイルcPAが特に好ましい。

一般式(I)で示されるcPA誘導体は、例えば、特開平5-230088号公報、特開平7-149772号公報、特開平7-258278号公報、特開平9-25235号公報に記載の方法等に準じて化学的に合成することができる。

あるいは、一般式(I)で示されるcPA誘導体は、特願平11-367032号明細書に記載の方法に準じてリゾ型リン脂質にホスホリパーゼDを作用させることによって合成することもできる。ここで用いるリゾ型リン脂質は、ホスホリパーゼDを作用しうるリゾ型リン脂質であれば特に限定されない。リゾ型リン脂質は多くの種類が知られており、脂肪酸種が異なるもの、エーテル又はビニルエーテル結合をもった分子種などが知られており、これらは市販品として入手可能である。ホスホリパーゼDとしては、キャベツや落花生などの高等植物由来のものや*Streptomyces chromofuscus*, *Actinomadula sp.*などの微生物由来のものが市販試薬として入手可能であるが、*Actinomadula sp.* No. 362由来の酵素によって極めて選択的にcPAが合成される(特開平11-367032号明細書)。リゾ型リン

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

脂質とホスホリパーゼDとの反応は、酵素が活性を発現できる条件であれば特に限定されないが、例えば、塩化カルシウムを含有する酢酸緩衝液（pH 5～6程度）中で室温から加温下（好ましくは37℃程度）で1から5時間程度反応させることにより行う。生成したcPA誘導体は、常法に準じて、抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー（TLC）などにより精製することができる。

次に、本発明の薬剤の作用の標的となるグリア細胞について説明する。

神経細胞の活動や維持を助けるグリア細胞の加齢に伴う老化、機能低下は老人痴呆と密接な関係がある。年老いた脳では、グリア細胞が著しく減少しており、特にミエリンの損傷、減少が著しい。

中枢神経系において、このミエリン形成の主要な役割を担っているのがオリゴデンドロサイトである。正常脳と老齢脳におけるオリゴデンドロサイトの細胞系譜と、その機能異常の解明は、単に軸索再生の鍵を握るのみでなく損傷を受けた神経細胞の機能回復にもつながる。

機能異常解明の一環として、後記する実施例では、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトへの機能性リン脂質cPAの作用の解明、細胞内応答のメカニズムの解明を試み、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトの増殖並びに分化と、ミエリン形成能の解明に焦点を当て、脳神経障害や老人性痴呆などの脳疾患に対する修復法及び予防法を開発することを目指した。

初めに、脳神経細胞の構成、分化、機能等について、図を参照しながら説明する。脳神経は図3に示すように様々な細胞が組み合わさって高次機能を発現している。グリア細胞は神経上皮細胞から分化しており、神経細胞よりはるかに数が多く神経細胞の活動、維持を助けている。高等動物ではニューロンやグリアの前駆細胞は、多分化能を残したまま周囲の状況により、ニューロンに分化したり、グリアに分化したりする。図4はその分化を示すものである。

アストロサイトには図4に示されるように放射状グリアを経るものとそうでないものとがある。0-2A前駆細胞を血清存在下におくとアストロサイトに分化させ

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

ることができる。アストロサイトは、オリゴデンドロサイトやニューロンなどの神経細胞にエネルギーを供給する働きをしている。例えば、0-2A 前駆細胞に対して働いている PDGF や bFGF 等の成長因子は、アストロサイトから分泌されている。アストロサイトの細胞は、表面抗体として、グリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) 及び A2B5 の蛋白質を発現している。GFAP は、アストロサイトに特異的なので、アストロサイトの細胞染色の際にはこれを指標として用いる。

オリゴデンドロサイトは 0-2A 前駆細胞から分化する。0-2A 前駆細胞は表面抗体として A2B5 を有しており、アストロサイトから分泌される PDGF、bFGF 等の成長因子に反応して増殖する。この細胞を無血清状態に置くことでオリゴデンドロサイトに分化させることができる。

図 5 に示すように、オリゴデンドロサイト (OL) はその分化段階によって、様々な特異的なタンパク質を発現している。また、それぞれの分化段階によってやはり PDGF、bFGF が特異的に働く。成熟したオリゴデンドロサイトになると、メッシュ状の突起を軸索に向かって伸ばし、軸索に巻きついてミエリン鞘を形成する。

本発明のグリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤は、ミエリン鞘形成に主要な役割を果たしているオリゴデンドロサイトの生存を促進することにより、神経細胞を保護して、その生存の促進に寄与することができ、それによって老人性痴呆などの脳血管性痴呆等による脳神経障害を治療できる。さらには、上記のような作用により、損傷を受けた神経細胞の機能回復に寄与することができる。

本発明のグリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤は、上記作用によって、ミエリン形成担当細胞の生存を促進することにより、脳への栄養供給を促進し、脳の老化を予防することができる。

本発明の薬剤は、1 又は 2 以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である一般式(I)で示される cPA 誘導体とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

本発明の薬剤は、種々の形態で投与することができるが、主な作用部位が脳で

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

あるため、血液一脳関門を通過できる形態であることが好ましい。そのような好適な投与形態としては、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げができるが、本発明の薬剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。

本発明の薬剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、溶解剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的成分は当業者に周知されている。

経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

の pH 調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

本発明の薬剤はヒトを含む哺乳動物に投与することができる。

本発明の薬剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として $1 \mu\text{g}/\text{k g}$ から $1,000 \text{mg}/\text{k g}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{k g}$ から $100 \text{mg}/\text{k g}$ 程度の範囲である。上記投与量の薬剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

本発明の薬剤は、神経障害の治療又は予防に有効な他の薬剤、脳神経にエネルギーを供給するような栄養剤等と併用することもできる。

なお、cPA それ自体は、後記する実施例1の結果から明らかのように哺乳類の脳に存在する物質であり、生体にとって安全であると考えられる。

本出願の優先権主張の基礎となる出願である特願2001-115999号の明細書に開示した内容は全て引用により本明細書に開示したものとする。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例

実施例1：ホスホリパーゼD（PLD）によるcPAの合成

実施例1では、放線菌由来PLDを用いてリゾホスファチジルコリン（LPC）からcPAを生成できること、並びに哺乳類の脳中にcPAを生成する酵素が存在することを明らかにした。

（A）材料及び方法

（A-1）実験材料

放線菌 *Streptomyces chromofuscus* (*S. chromofuscus*) 由来の PLD、キャベツ由来の PLD は、Sigma 社より購入した。*Actinomadura sp.* No. 362 (*A. sp.* No. 362) 由来の PLD は、名糖産業より購入した。1-オレオイル LPC (1-oleoyl LPC)、リ

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

ゾホスファチジルセリン(lysophosphatidylserine; LPS)は、Avanti Polar lipid, INC. 社より購入し、リゾホスファチジルエタノールアミン(lysophosphatidylethanolamine; LPE)は、Doosan Serdary Res. Lad. 社より、1-アルキルリゾホスファチジルコリン(1-alkyl lysophosphatidylcholine; 1-alkyl LPC)、1-アルケニルホスファチジルコリン・プラズマロゲン(1-alkenyl phosphatidylcholine plasmalogen; 1-alkenyl LPC)は、Sigma 社より購入した。また、Kobayashi, S., 他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050(1993)に記載の方法に準じて有機合成したオレオイルcPA(oleoyl cPA)も使用した。

(A-2) 1-NBD-LPC の合成

cPA生成活性測定の為の基質として、蛍光標識されたLPCの調製を行った。すなわち、1-ヘキサデカノイル-2-(12-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル))-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(2-NBD-HPC; Avanti Polar lipids, INC. 社製)を出発原料とし、リバーゼ(*Rhizopus delemere*由来; 生化学工業社製)で1位の脂肪酸のみを脱アシル化した後、トリス塩酸バッファー(pH=9)中で、2位の蛍光アシル基を1位に転位させ、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて精製したものを1-NBD-LPCとした。

(A-3) cPA生成活性測定

基質として、1-NBD-LPCと卵黄由來のLPCを1:99で混ぜ合わせたものを使用した(1% NBD-LPC)。100 μM 1%NBD-LPC存在下、10mM 塩化カルシウムを含む100 mM 酢酸バッファー(pH=5.6)中で酵素アッセイを行った。酵素源として、放線菌*S. chromofuscus*由來のPLD2.2 μg/ml、または、放線菌*A. sp.* No. 362由來のPLD1.4 μg/mlを用いた。反応は30°C(*S. chromofuscus*の場合)または、37°C(*A. sp.* No. 362の場合)で行った。反応終了時に反応液の0.3倍容の0.1M クエン酸を加えて、溶液を酸性にした後に、クロロホルム:メタノール(2:1)混液を反応液の5.4倍量加

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

え、遠心(1,400×g、5分)して下層に、脂質を抽出した。もう一度、クロロホルム：メタノール(2:1)混液抽出操作を同様に繰り返した後に、下層を合わせて窒素気流下で濃縮・乾固させた。得られた脂質を少量のクロロホルム：メタノール(2:1)混液に再溶解させて、シリカゲル (Silica Gel) 60F 薄層クロマトグラフィープレート(TLC; E. Merck 社製)にスポットし、展開溶媒；クロロホルム／メタノール／酢酸／5%二亜硫酸ナトリウム水溶液(100:40:12:5)で脂質を分離し、各蛍光スポットの強さを、蛍光イメージ分析器 (fluoroimage analyzer) FLA-2000(富士フィルム社製)で定量分析した。

(A-4) ESI-MS/MSによる構造解析

エレクトロスプレー型イオン源をタンデム四重極型質量分析計に装備したクアットロ II (Quattro II ; Micromass 社製)と HPLC を連結した装置を使用して、陰イオンモードで分析した。ヒューレットパッカードモデル (Hewlett Packerd model) 1050 HPLC ポンプ (Hewlett Packerd 社製)を用いて、アセトニトリル／メタノール(1:1)混液により $5\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で溶出した。サンプルは、0.1%ギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル／メタノール(1:1)混液中に $10\sim50\text{pmol}/\mu\text{l}$ の濃度になるように脂質を溶かしたものを、 $3\sim5\mu\text{l}$ 注入した。ギ酸とアンモニアは、サンプルがイオン化される時に、それぞれプロトンの供与体、受容体として働く。HPLC と MS のインターフェイスは 80°C に維持し、溶媒を蒸発させる窒素ガスは圧力 40psi、流速 $0.4\text{l}/\text{分}$ に設定した。MS 分析において cone voltage -30eV で分子イオンを、MS/MS 分析において cone voltage -90eV で脂肪酸を、-170eV でリン酸をモニターした。MS/MS 分析の際には、不活性ガスを導入して局部的に高圧な部位を作り、分子イオンを衝突活性開裂 (collision induced dissociation ; CID) させてドーターイオンを発生させる手法を組み合わせた。衝突ガス (collision gas) にはアルゴン(圧力 $3.0\sim4.5\text{e}^{-4}\text{Torr}$)を用い、衝突エネルギー (collision energy) は -50eV に設定した。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

(A-5) NIH-3T3における各種リゾリン脂質の添加によるストレスファイバーの形成

マウス由来纖維芽細胞 NIH-3T3 は、10%のウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS ; Moregate 社製) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; DMEM) で培養しているものを実験に用いた。NIH-3T3 を 22mm 径のカバーガラスを敷き詰めたシャーレ (10cm 径) 中に 2.5×10^4 細胞で植え継ぎ、24 時間後に FBS を含まない培地に変え、その後 48 時間血清飢餓状態で培養した。10 μM のリゾリン脂質を加え、37°C、30 分間インキュベートすることで細胞に刺激を与えた後に、3.7%パラホルムアルデヒドと 0.1%トリトン (Triton) X-100 を含むダルベッコの PBS (Dalbecco's PBS) で室温にて、10 分間固定した。その後、5 単位/ml のローダミンファロイジン (rhodamine phalloidin ; フナコシ社製) で 37°C、1 時間染色した。カバーガラスを PBS で 3 回洗浄した後に、共焦点レーザー顕微鏡 TCS NT レーザー制御走査型顕微鏡 (Control Laser Scanning Microscope ; Leica 社製) で観察した。

(A-6) ラット脳中の cPA 生成活性の測定

材料として、雄 4 週齢のスプラグードーレイ系ラット (Sprague-Dawley rat) を用いた。ラットはエーテル麻酔をかけた後、断頭し、全脳を摘出し、-80°C で保存した。保存してあつたラット全脳の左右いずれかの半分 (約 0.8g) に、10 倍量の 0.32M ショ糖液を加え、ポリトロンホモジナイザー (Polytron Homogenizer ; Polytron 社製)、パワーコントロール (power control) 7 で、20 秒間 2 回ホモジナイズした。この液の体積の 2 倍量のヘペスバッファー (Hepes buffer) を加え、ホモジネート溶液とした。cPA 生成活性の測定は、以下の溶液組成で行った。すなわち、基質として 1%NBD-LPC 40nmol または、1 位脂肪酸のカルボキシル基の炭素を放射標識した ^{14}C -LPC と非標識の LPC を 2:55 の比率で混ぜたもの (120nCi) を用い、オレイン酸ナトリウム 450 μM 存在下のホモジネート溶液 100 μl 中 37°C で反応させた。反応終了後の処理については、放線菌 PLD アッセイの条件に準じた。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

(B) 結果

(B-1) 放線菌 PLD による LPA/cPA の生成

1%1-NBD-LPC を基質として、リン酸基転位活性の強弱の異なる 2 種類の放線菌由来の PLD を用いて cPA の生成が見られるか否かを検討した。*S. chromofuscus* 由来の PLD を用いた場合、20 分間反応させると、主な生成物として 1-NBD-LPA のみが得られた。しかし、リン酸基転移活性が高いとされている *A. sp. 362* 由来の PLD を用いると、LPA とは異なった生成物が主に得られ、この化合物の Rf 値は、有機合成した cPA 標品（オレオイル cPA）と一致した。これらの反応の違いを確認するため、それぞれの酵素の濃度依存性、さらに反応の時間依存性を検討した。*S. chromofuscus* 由来の PLD を用いた場合は、基質である LPC が減少するのに伴って、LPA の生成のみが見られた。それに対し、*A. sp. 362* 由来の PLD を用いた場合には、cPA に相当する生成物の増加が見られたのみで、LPA の生成はほとんど見られなかった。このことは、PLD の種類によって、基質が同じであっても生成物が異なることを示している。また、酵素学的解析の進んでいるキャベツ由来の PLD を用いたときには、LPA と cPA の両方が約 6:4 の割合で生成した。

ここで、cPA 相当の化合物を生成する *A. sp. 362* 由来の酵素について、さらに基質特異性を調べてみた。基質として各 100 μM の 1-acyl LPC、1-alkyl LPC、1-alkenyl LPC、LPS、LPE を用い、標準的な PLD アッセイ条件に準じて反応を行わせた。それぞれの基質からの生成物を TLC を用いて分離し、LPA、cPA 相当のスポットをかきとり、リン定量を行って、生成量を測定した。いずれの基質においても LPA の生成はほとんど見られなかった。LPC、1-alkyl LPC、あるいは 1-alkenyl LPC を基質として用いた場合には、時間依存的に cPA が生成したが、LPS、LPE を基質として用いた場合には cPA は生成されなかった。この結果より、*A. sp. 362* 由来 PLD は、極性基部分にコリン（choline）を有するリゾリン脂質から効率よく cPA を生成することが示された。また、alkyl、alkenyl 型 LPC も cPA 生成の基質になりうることがわかった。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

(B-2) *A. sp.* 362 由来 PLD 反応生成物の構造解析

1 位脂肪酸にオレイン酸を持つ 1-oleoyl LPC を基質として *A. sp.* 362 由来 PLD で反応させたときの主生成物 (cPA と同じ Rf 値を持つ化合物) について、その構造解析を行う為、質量分析を用いた。まず、質量分析の条件を設定するため、スタンダードとして有機合成した 1-oleoyl cPA を ESI-MS/MS にかけ、陰イオンモードで分析した。その結果、上記した条件で、1-oleoyl cPA の分子イオン $[M-H]^-$ に合致する m/z 417 のピークが観察された。同一条件下で PLD 反応生成物について分析したところ、同様に m/z 417 のピークが強く観察された。分子イオンに相当するピーク群について、さらに構造情報を得るため、in-source fragmentation によるタンデムマススペクトリー (MS/MS) を行った。スタンダード cPA の分子イオン m/z 417 を親イオンとしたドータースキャンの結果、いくつかの特徴的イオンピークが発生し、以下のように解釈された。すなわち、 m/z 281 は $C_{17}H_{33}COO^-$ 、 m/z 153 は $[M-C_{17}H_{33}CO]^-$ 、 m/z 79 は PO_3^- に相当する。一方、PLD 反応によって得られた m/z 417 ピークについて同様に MS/MS 分析をした結果、同一の特徴的なフラグメントピーク群が認められた。以上より、*A. sp.* 362 由来 PLD 反応によって作られた化合物が cPA であることが確認された。

(B-3) PLD 反応生成物による NIH-3T3 細胞でのストレスファイバーの形成

放線菌 *A. sp.* 362 由来 PLD 反応で得られた生成物が cPA と同一の化合物であることを更に確認するために、その生物活性を検討した。すなわち、cPA の持つ生理活性の 1 つである、繊維芽細胞でのアクチントレスファイバーの形成能を調べた。血清飢餓状態にしたサブコンフルエント (subconfluent) 状態の、マウス由来繊維芽細胞株である NIH-3T3 に $10 \mu M$ の LPA、化学合成された PHYLPA、あるいは PLD 反応生成物である cPA をそれぞれ $37^\circ C$ で 30 分間与え、ローダミンファロイジンでアクチンのストレスファイバーを染色し、観察を行った。脂質を添加しなかったコントロールの細胞では、ストレスファイバーの生成が見られなかった

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

のに対し、用いた3種のリゾリン脂質でいずれもストレスファイバーの形成が見られた。

(B-4) ラット脳における cPA の生成

ラット脳中に cPA 生成活性があるか否かを検討した。異なる複数の条件下で検討を行った結果、最終的にショ糖水溶液(0.32M)でホモジネートを作成し、20 mM ヘペスバッファー(pH 7.2)中、オレイン酸(450 μM)存在下で活性の測定を行ったところ、37°Cで60分間インキュベーション後、cPA 相当のスポットが確認された。

(C) まとめ

上記結果より、PLD と総称されるリン脂質加水分解酵素のうちの特定の酵素によって cPA を生成できることが示された。現在精製品として市販されている PLD の中でも、その酵素源が異なると、LPC を基質にした場合、異なる生成物が得られることがわかった。

実施例1において、ラット脳ホモジネート中に LPC から cPA を生成する酵素活性が検出できたことは、ホスファチジル基転移反応が、生理活性脂質である cPA の産出に積極的に貢献していることを示している。哺乳類の脳の中には、cPA が存在することが示され、また、PLD 活性についても脳は比較的高い活性を有することが分かった。基質の LPC は、通常の生理活性条件下では脳内にほとんど検出されないが、ある種の PLA₂ の活性化を経て生成されると考えられる。

放線菌 *A. sp.* 362 由来 PLD を用いることにより、効率よく cPA が調製できることは cPA の構造類似体を作成する上で有用である。このような酵素を用いた調製法では、1-alkenyl LPC から cPA を調製することが可能である。1-alkenyl LPA はウサギ角膜損傷時に検出され、細胞増殖活性を有し、創傷の治癒に関与していることが考えられている。この他、脂肪酸の異なった LPC から、対応する LPA/cPA を調製することが可能である。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

実施例 2：オリゴ дендроサイトの初代培養の確立

未成熟のオリゴ дендроサイトを成熟させるためには、アストロサイトとの直接接触による共培養が必要である。アストロサイトとの共培養を経て分化しミエリン形成担当細胞へと成熟することができる。ニューロンと共培養しても未成熟のままである。また、オリゴ дендроサイトは非常に不均一な集団を形成する細胞であるため、培養では前駆細胞の大量調製法が大きな焦点となる。これらを考慮して、先ずオリゴ дендроサイトの培養法を以下の通り確立した。

(1) 培養液、試薬の調製

(i) MEM⁻ (血清を添加していないもの)

粉末のイーグル MEM 培地 4.7g を純水に溶解し、121℃のオートクレーブで 15 分間高圧滅菌し、室温まで冷却する。ここに 40g/ml グルコース 5.0ml、2.92g/100ml L-グルタミン 5.0ml (-20℃冷蔵庫で保存) を加える。pH が 7.4~7.6 になるように NaHCO₃ を加えて pH 調整をしたものと、4℃冷蔵庫で保存した。

(ii) MEM⁺ (血清を添加したもの)

MEM⁻に 10%濃度になるようウシ胎児血清 (FBS) を加えたものを 4℃冷蔵庫で保存した。

(iii) PBS⁻

ダルベッコ PBS (-) 粉末 4.8g を純水に溶解し、121℃のオートクレーブで 15 分間高圧滅菌し、室温まで冷却したものを、4℃冷蔵庫で保存した。

(iv) B.S medium(無血清培養液)を 4℃冷蔵庫で保存した。

(2) 前日の準備

0.02mg/ml のポリーラリジン (PLL) 溶液を 1 ディッシュ (10cm)当たり約 3ml 添加し、クリーンベンチ内に静置した。当日に PLL コートを行う際は同様にディッシュに添加した後インキュベーターに 15~30 分程入れた。当日は細胞を播く前にディッシュを純水で 2 回洗浄した。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

(3) 実験手順

妊娠18日齢(18E)の母ラット(E18Wister Rat)を適量のジエチルエーテル入りの麻酔瓶の中に入れて麻酔をかけた。麻酔時間は3~5分とし、死亡する直前で止めた。母ラットを麻酔瓶から取り出し、適当なバットの上に仰向けにして下腹部をエタノールで消毒した。尾から3~4cm付近にはさみで切れ目を入れ、この切れ目からはさみを挿入して横に開き皮と内膜を分離させた。まず、皮の部分を切り開き内膜を露出させる。内膜が露出したら再びエタノールで消毒をし、内膜を切り開いて子宮を取り出した。子宮を持ち上げながらY字になっている部分を切り、子宮を取り出した。胎児脳へのダメージを減らすため、取り出した子宮は冷却したMEM⁻へ入れた。

これ以下の作業は全て無菌室のクリーンベンチ内で行った。胎児は子宮の二重の膜に包まれているので、その中から取り出し、冷却MEM⁻に入れた。ピンセットで胎児をつかみ、頭部を切開した。まず、口の部分をハサミで横に切り、次に口から顔面の中央を額に向かって真っ直ぐ深くハサミを入れ、さらに、耳の方向に向かってY字に切った。先の尖ったピンセットで頭皮、頭蓋骨をはずし、脳が剥き出しになつたらピンセットですくい出し、新しいMEM⁻に入れた。

取り出した脳を、臭覚領域を左において、ピンセットで右方向に向かって髄膜を剥がした。次に、脳を裏返して、裏側についている余分なものを取り除いた。最後にもう一度血管を全て取り除いた。

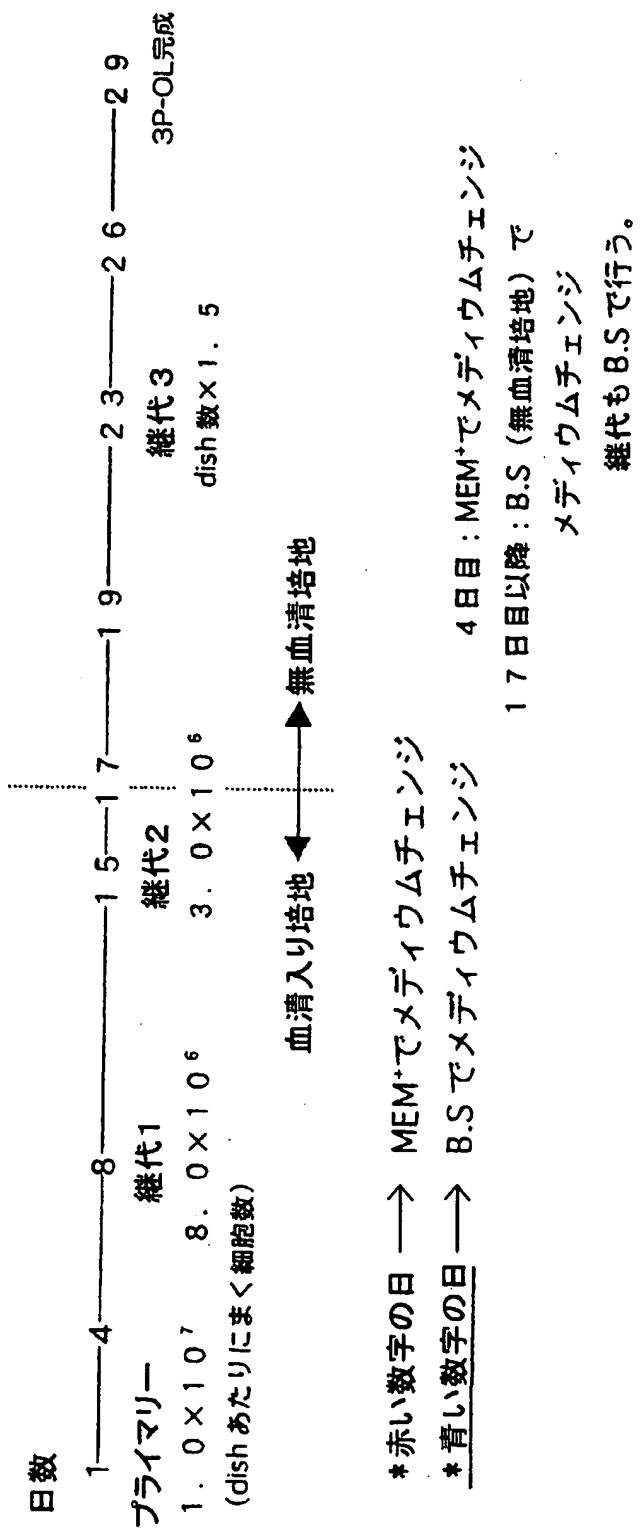
ディスパーゼ(disperse) I (3U/ml)を2ml添加した35mmディッシュに大脳皮質を丸型ピンセットでつまみ入れた。37°CでCO₂5%、湿度95%のインキュベーター中に5分間置いた。そこに、Dnase (1ml)を加え、再び10分間インキュベーター中に置いた。先をあぶって丸くしたペストルピペットを使って、泡立てないように注意しながら十分ピッティングし、細胞をさらさらの状態にする。50mlチューブの上に70μmのメッシュを載せ、適量のMEM⁻でメッシュを湿らせた。細胞懸濁液をメッシュを通してチューブ中に注ぎ、次いで、MEM⁻を2ml程度注ぎ、メッシュを洗った。メッシュを外し、MEM⁻で30~40mlにメスアップした。得られ

WO 02/083149**PCT/JP02/03659**

た試料を 1000r. p. m で 5 分間遠心し、上清を取り除き、再び MEM⁻ で 30~40ml に メスアップし、ピペッティングをして再度 1000r. p. m で遠心した。上清を取り除き、今度は MEM⁺ を 30ml 加え、十分ピペッティングし、セルカウンターで細胞数をカウントした。PLL コートしたディッシュに 1 ディッシュ当たりの細胞数が 1.0 × 10⁷ になるように細胞懸濁液を播いた。最終液量がディッシュ当たり 10ml になるように MEM⁺ を加えて調整し、インキュベーター中で培養した。以後は以下の表に示す日程に従って、培地交換と継代を行った。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659



WO 02/083149

PCT/JP02/03659

なお、培地交換、継代は以下の通り行った。

(培地交換)

ディッシュの培養液を捨て、PBS(-)3ml程度で2回洗い、新しい培養液を10ml注ぐ。17日目からの培地交換はB.S(無血清培地)を用いて行う。また、1回目の培地交換の時のみ1ディッシュ当たり $200\mu l$ のbFGFを加える。これは0-2A前駆細胞を増やすためである。

(継代)

5ml程度のPBS(-)でディッシュを2回洗う。1回目の継代のときには、2回目にPBS(-)を注いだ後、2~3分そのままにしておく。0.05%トリプシンを2~3ml加え、8分間37°Cインキュベーターに静置する。顕微鏡で細胞の様子を観察した後、トリプシンは捨てずに、MEM⁺をトリプシンと同量加えてピペッティングし、トリプシンの働きを止める。1000r.p.m.で5分間遠心し、上清を捨てた後、MEM⁻を20~30ml加えて再度ピペッティングし、1000r.p.m.で遠心する。セルカウンターで細胞数をカウントする。上清を捨てMEM⁺(3回目の継代のときにはB.S)を20~30ml加えてピペッティングしセルカウンターで細胞数をカウントする。それぞれの継代の段階に応じ、以下の数でディッシュに細胞を播きインキュベーター内で静置培養する。

1回目 : 8.0×10^6

2回目 : 3.0×10^6

3回目 : ディッシュ×1.5 (細胞数)

(4) 実験結果

図6に上記の培養の概要と、実際に培養を行った結果を併せて示す。

最初の1週間は、0-2A前駆細胞、プロオリゴデンドロサイト(プロOL)の他に、ニューロン、アストロサイトなど様々な細胞が混在した状態である。しかし、継代にトリプシンを用いることにより、トリプシン感受性の高いニューロンが除去される(図6中、1P-6日目の結果を参照)。この段階ですでに成熟しているオリ

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

ゴデンドロサイト（成熟 OL）は、アポトーシスを起こして脱落していく。

最初はウシ胎児血清（FBS）を添加した MEM 培地で培養するが、2回継代した後に、無血清培地（B. S）に切り替えることで、0-2A 前駆細胞をオリゴデンドロサイト細胞系譜に導入し、アストロサイトを死滅させていく（図 6 中、2P-6 日目の結果を参照）。

上記のようにして、29 日目にはほぼ分化段階の揃った、95%以上純粹なオリゴデンドロサイトの培養系を得ることができる（図 6 中、3P-OL の結果を参照）。

実施例 3 : cPA 及び LPA のオリゴデンドロサイト培養系細胞への影響

実施例 2 に記載したオリゴデンドロサイト培養系で、初代培養の段階から、cPA 又は LPA を添加する実験を行った。特に、脂質を加えた際に、細胞の生存率（サバイバル）、分化、増殖がどのように変化するかに焦点を当てた。

(1) 実験方法

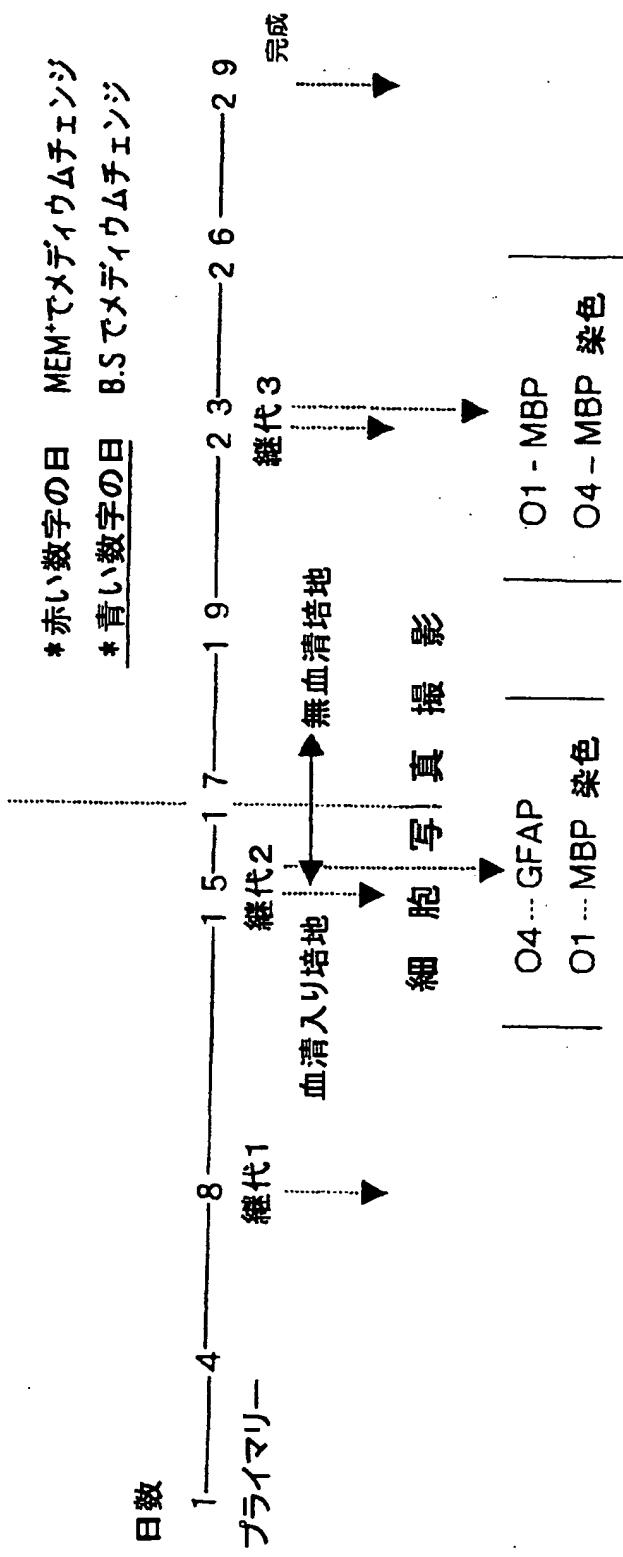
細胞培養の実験手順は実施例 2 と同様である。

初代培養の段階から、継代、培地交換毎に 1 ディッシュ当たり $5 \mu\text{M}$ になるよう cPA 又は LPA を添加した。なお、本試験に用いた cPA 誘導体は、実施例 1 に記載した方法に従って、基質として、オレオイル LPC を使用し、酵素源として、放線菌 *A. sp.* No. 362 由来の PLD を用いて合成したオレオイル cPA である。

培地交換の場合は培養液を交換する際に一緒に cPA 又は LPA を添加したが、継代の場合は、継代終了後、インキュベーターで 2~3 時間静置し、細胞がディッシュに接着するのを確認してから添加した。また、それぞれの段階で、細胞の蛍光染色を行い分化段階特異的発現タンパクをみることで、細胞の分化の様子を観察した。下記の表に従って培地交換と継代を行った。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659



WO 02/083149

PCT/JP02/03659

また、3P-OLは3日毎に細胞の写真撮影、蛍光染色を行った。3P-OLの蛍光染色は表2に記載のものと同じ抗体の組み合わせで行った。次に、蛍光染色の方法を説明する。

本試験例の細胞染色に用いた抗体は01、04、MBP、GFAPの4種類である。これらの発現タンパクについて、簡単に説明する。

04：早期未成熟オリゴの段階から最後までオリゴデンドロサイトに発現

01：中期未成熟オリゴの段階から最後までオリゴデンドロサイトに発現

MBP（ミエリンベーシックプロテイン）：後期未成熟オリゴの段階から最後までオリゴデンドロサイトに発現（MBPはかなり matureな段階に近づかないと発現しない。細胞体から突起へと発現が広がっていくため突起の先端のほうが染まっているほど成熟しているといえる。）

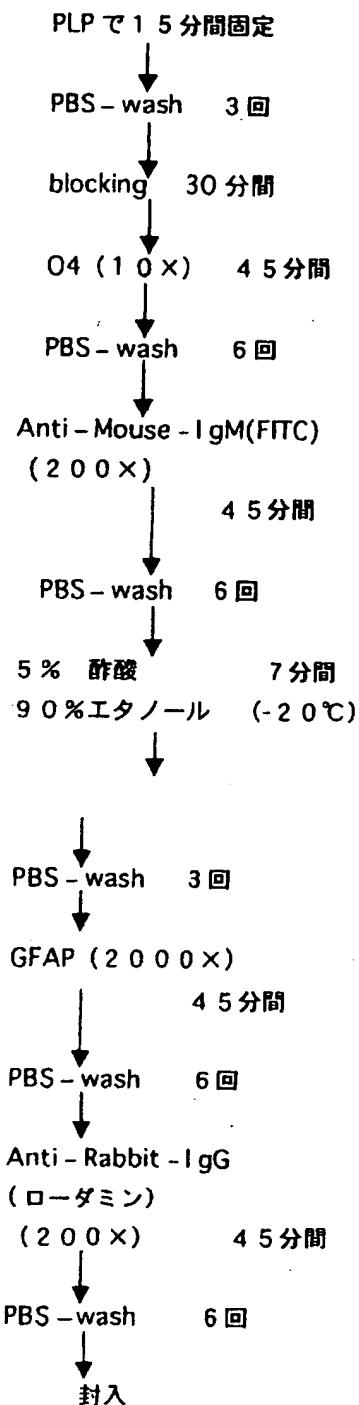
GFAP(glial fibrillary acidic proteins)：グリア線維性酸性タンパク質。成熟アストロサイトに発現する。

下記表3に04-GFAP二重染色の場合及び01(04)-MBP二重染色の場合の蛍光染色のプロトコールを示す。

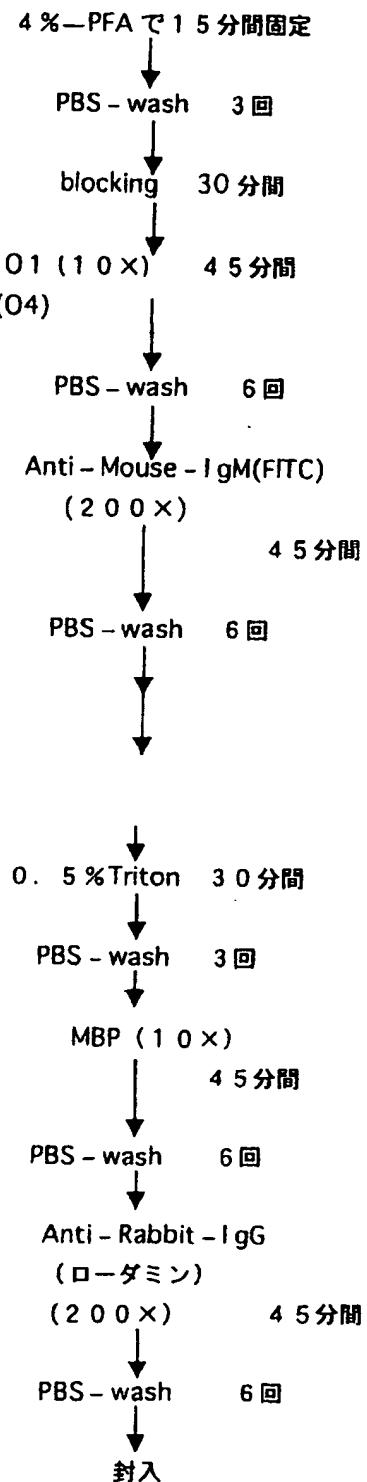
WO 02/083149

PCT/JP02/03659

O4 - GFAP 二重染色の場合



O1(O4) - MBP 二重染色の場合



WO 02/083149

PCT/JP02/03659

染色の際には、スライドガラスを用いた。培養の際、ディッシュの中に PLL コートをしてあるスライドガラスを投入しておき、染色の際には、スライドガラスを取り出して、そこに接着している細胞を染色した。

(2) 実験結果

初代培養から 6 日経過後 (P-6 日目) の培養細胞を図 7 に示す。コントロール及び LPA 添加では、細胞の様子に大きな差は見られないが、cPA 添加では、細胞がアグリゲーションを起こし、ニューロンが束化していることがわかる。また、束化したニューロンによってアグリゲートした細胞同士が繋がり合い、コンタクトを取り合っているように見える。

第 1 回継代後 6 日経過後 (1P-6 日目) の培養細胞を図 8 に示す。図 8 中の白い粒々は 0-2A 前駆細胞であるが、LPA 添加のものと cPA 添加のもの、特に cPA 添加のものでは、コントロールと比べて、この前駆細胞が非常に増加していることがわかる。また、細胞密度も cPA 添加のものは他のものと比べて非常に高くなっていることもわかる。

第 2 回継代後 6 日経過後 (2P-6 日目) の培養細胞を図 9 に示す。この時にはすでに無血清培地に切り換えた後なので、コントロールではアストロサイトが弱つて変形し、細長く伸びてしまっていて、細胞密度もあまり高くない。LPA 添加のものも、コントロールほどではないが、やはり細胞密度が低下してきていることがわかる。これに対し、cPA 添加のものは、アストロサイトが依然として元気なままで、細胞密度も以前と変わらず高いままである。

この段階の細胞の分化の様子を観察するために細胞を染色して蛍光顕微鏡で撮影したものを図 10 に示す。上段が位相差像 (Phase)、中段がオリゴデンドロサイトの抗体である O4 で染色したもの、下段がアストロサイトの抗体である GFAP で染色したものである。コントロールではアストロサイトが死滅し、ぼろぼろになっているのがわかる。また、オリゴデンドロサイトの分化もあまり進んでいないため、突起も短い状態である。LPA 添加のものでは、まだアストロサイトの組

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

織が確認でき、04 染色の写真を見ると、コントロールと比べてオリゴデンドロサイトの突起が長く伸び、細かいメッシュ状になってきており、分化が進んでいることがわかる。cPA 添加のものでは、アストロサイトの組織が密に存在していることが確認できる。

第3回継代後6日経過後(3P-0L)の培養細胞を図11に示す。コントロールでは、余計な細胞は死滅し、殆ど成熟オリゴデンドロサイトのみの状態になっている。これに対し、cPA 添加のものでは、細長く変形したアストロサイトが依然として残っている。LPA 添加のものでは、アストロサイトは殆ど残っておらず、また、オリゴデンドロサイトの突起がアポトーシスを起こしてぼろぼろになり始めていることがわかる。

この段階のオリゴデンドロサイトの分化の様子を観察するために細胞を染色して蛍光顕微鏡で撮影したものを図12に示す。上段が位相差像、中段がオリゴデンドロサイト抗体04による染色、下段がオリゴデンドロサイト抗体MBPによる染色である。04及びMBPは共にオリゴデンドロサイト抗体であるが、04は早期のオリゴデンドロサイトでも染色できるのに対し、MBPは分化の進んだオリゴデンドロサイトしか染色できない。

cPA 添加、LPA 添加のものは、コントロールと比べてMBPの発色が強く、突起の先端の方まできれいに発色している。MBPは細胞体から発現し始め、次第に突起の先端に向かって発現が伸びていくので、突起の先端の方まで染まっているほど分化が進んでいると言える。特に、LPA 添加のもので、突起の先端まで染まっていることがわかる。

通常の培養では、ここまで段階で実験を終了するが、さらに10日間培養を継続した培養細胞を図13に示す。オリゴデンドロサイトは通常であれば突起が伸びて軸索に巻き付き、ミエリン鞘を形成するが、そうでない場合には、突起の先端の方からアポトーシスを起こしてメッシュ状の突起がぼろぼろになっていく。これは、LPA 添加のもので著しく観察され、細胞数自体も減少し、突起がぼろぼろになっていくことがわかる。これに対し、cPA 添加のものでは、この段階にな

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

つてもアストロサイトが生存し続け、その周りにあるオリゴデンドロサイトの突起もアポトーシスを起こしていないものが多数観察される。

(3) 考察

上記実験から、cPA は培養初期に細胞のアグリゲーションやニューロンの束化を引き起こすこと、cPA は培養初期に 0-2A 前駆細胞の増殖を促進すること、並びに cPA は培養全般を通してアストロサイトの生存（サバイバル）を促進していることが判明した。

cPA は、培養初期に、細胞のアグリゲーションやニューロンの束化を引き起こすことが観察されたが、これは、神経細胞間のコンタクトを促進し、神経細胞の維持につながると考えられる。また、cPA は、オリゴデンドロサイトへ分化する 0-2A 前駆細胞の増殖を促進することで、オリゴデンドロサイトのサバイバルを促進し、ミエリン形成を促進できると考えられる。

アストロサイトはオリゴデンドロサイトに栄養を供給しているので、このオリゴデンドロサイトのサバイバルの促進にはアストロサイトが大きく関与していると考えられる。従って、cPA は、アストロサイトのサバイバルを促進することで、オリゴデンドロサイトへの栄養の供給を維持し、それによって、オリゴデンドロサイトのサバイバルが延びていると考えられる。

老齢者の脳では、グリア細胞が著しく減少しており、ミエリンが損傷、減少していることが判明している。cPA は、上記のように、ミエリン形成の主要な役割を担当するオリゴデンドロサイトのサバイバルを促進することによって、脳の老化を遅らせ、さらには、損傷を受けた神経細胞の機能回復にも寄与しうると考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明によって、老人性痴呆などのグリア細胞の減少が著しく、特にミエリンの損傷、減少が著しい脳血管性痴呆などにおいて、ミエリン形成の主要な役割を

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

担っているオリゴデンドロサイトの増殖及びサバイバルを促進することにより、損傷を受けた神経細胞の機能を回復することができる脳神経障害治療剤が提供された。

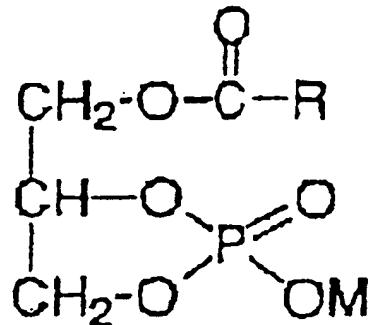
本発明によって、神経細胞の活動、維持を助けるグリア細胞の増殖、分化及び／又は生存（サバイバル）を促進できる薬剤が提供され、脳血管性痴呆などのグリア細胞の減少を伴なう神経疾患が提供されるようになった。

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

請求の範囲

1. 一般式(I) :

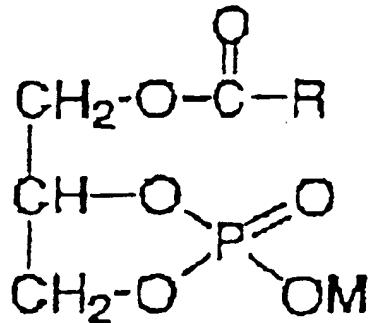


(式中、Rは、炭素数1~30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤。

2. グリア細胞が、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞、アストロサイトまたはミクログリアから選択されることを特徴とする、請求項1に記載の薬剤。

3. 一般式(I) :



(式中、Rは、炭素数1~30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、グリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤。

4. グリア細胞の減少を伴なう神経疾患が脳血管性痴呆である、請求項3に記載の薬剤。

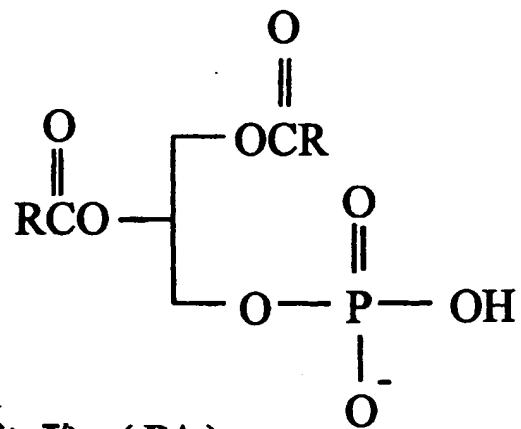
5. 脳血管性痴呆がビンスワンガー型痴呆である、請求項4に記載の薬剤。

6. 一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体が、1-オレオイル環状ホスファチジン酸である、請求項1から5の何れかに記載の薬剤。

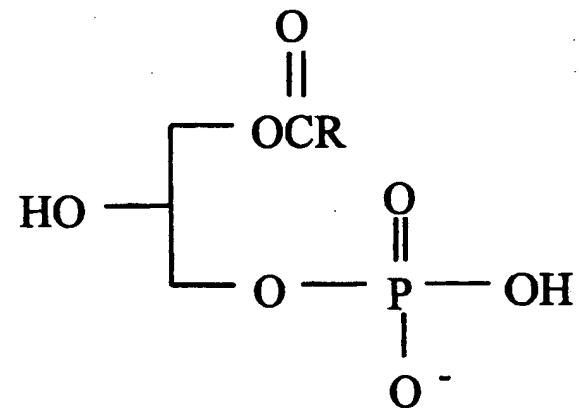
WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図 1



ホスファチジン酸 (PA)

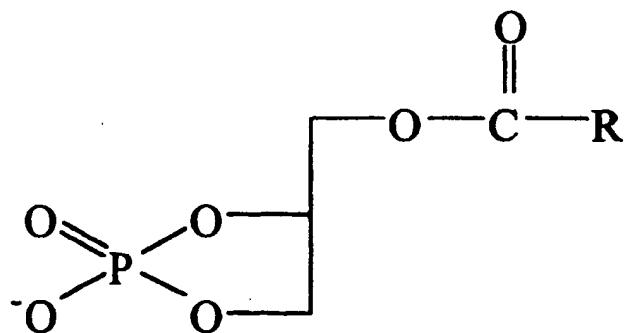
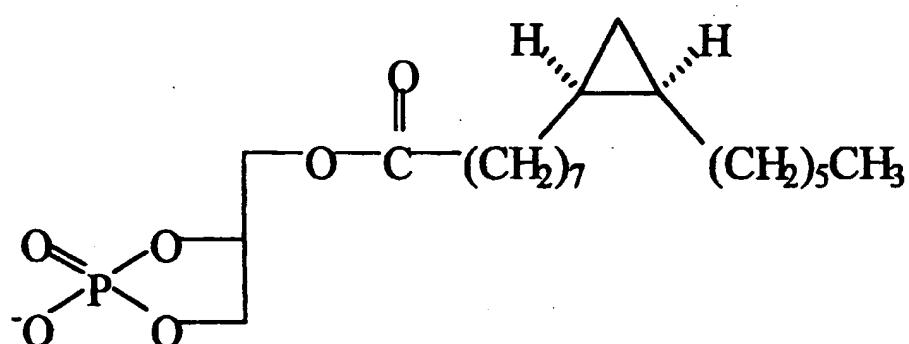
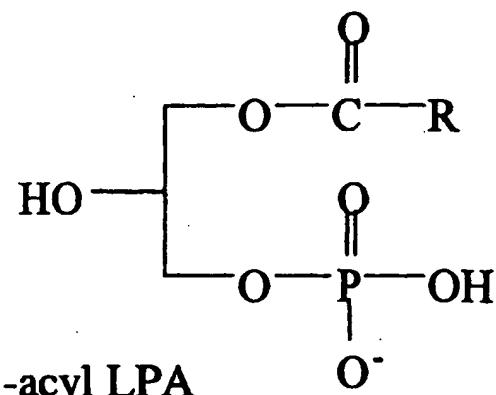


リゾホスファチジン酸 (LPA)

WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図 2



WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図 3

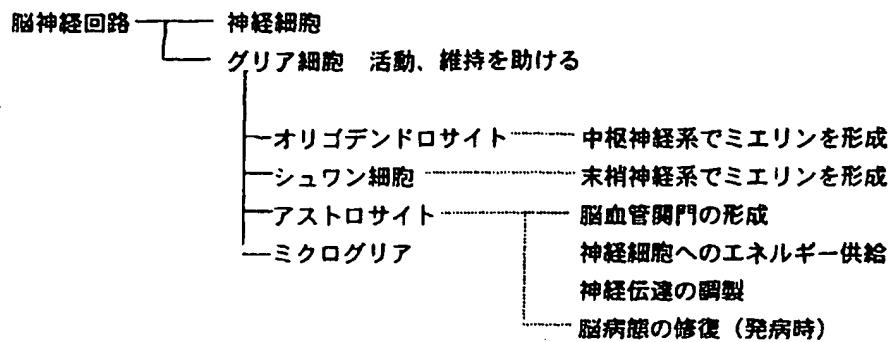
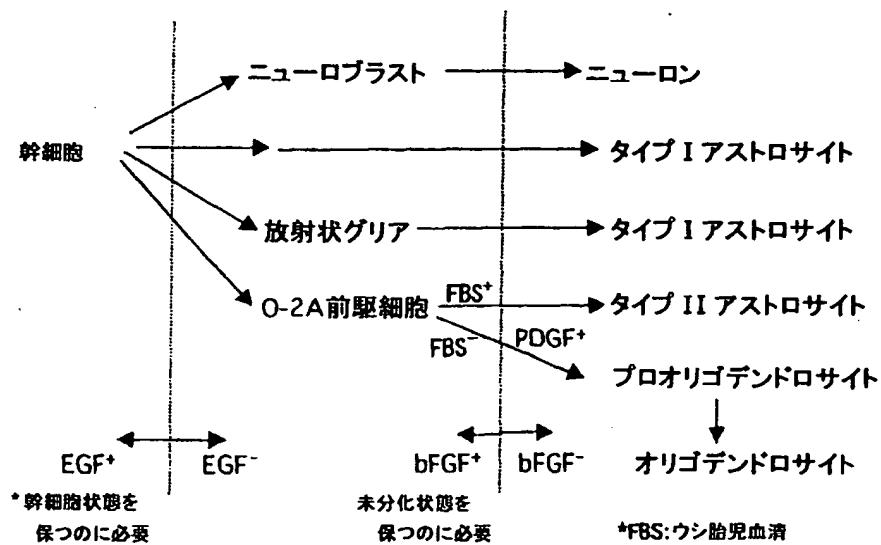


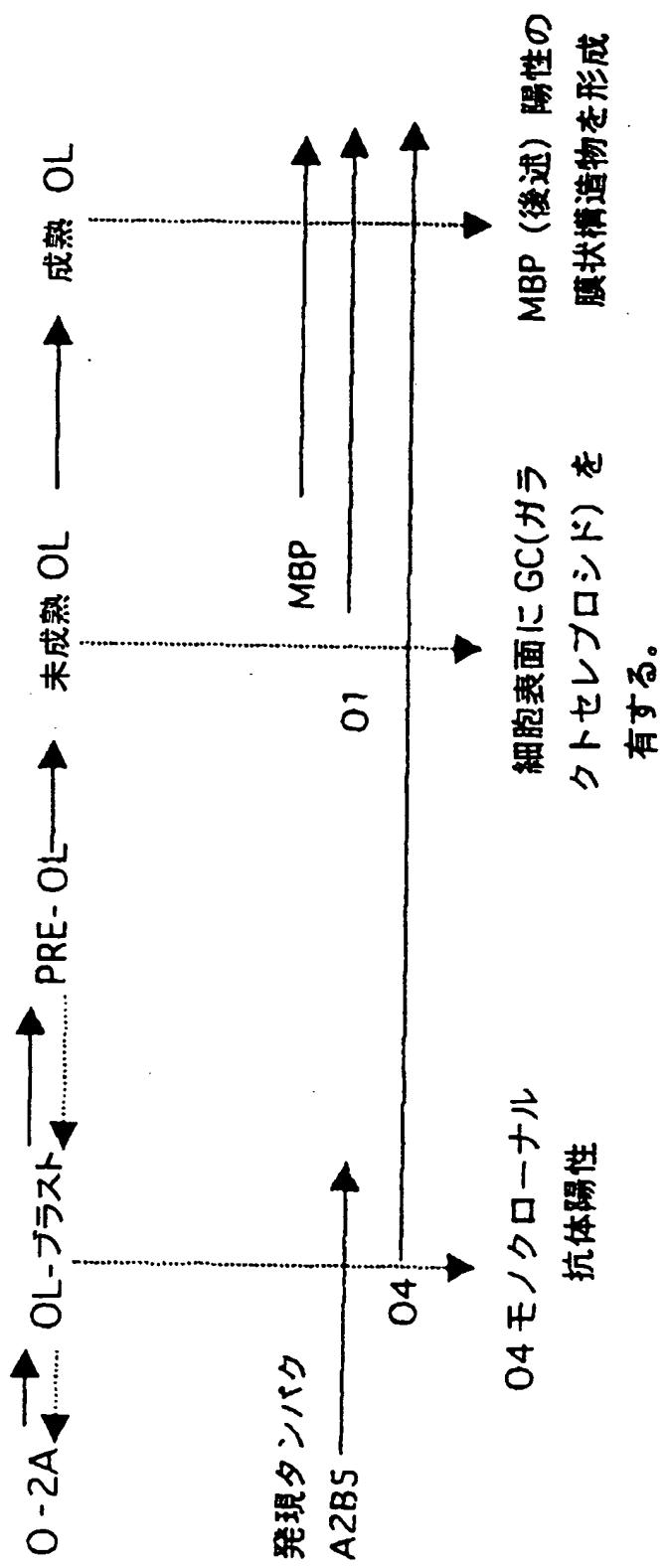
図 4



WO 02/083149

PCT/JP02/03659

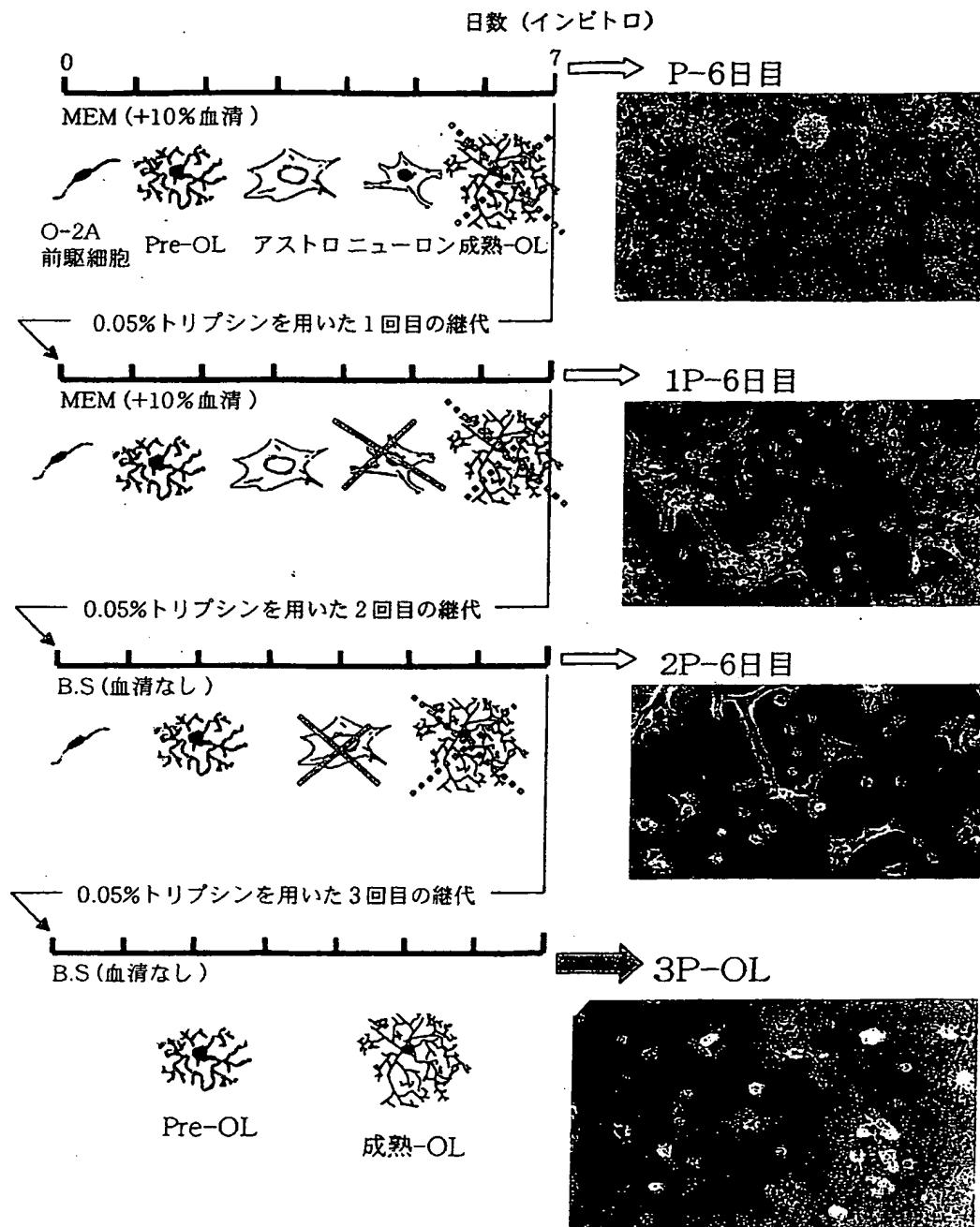
図 5



WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図 6

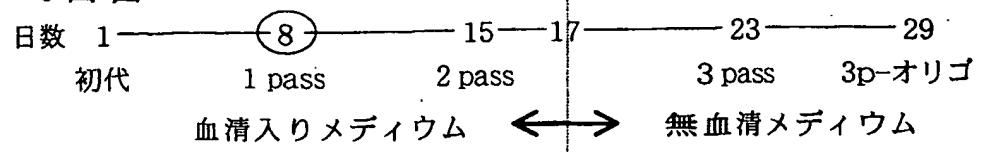


WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図 7

P-6日目



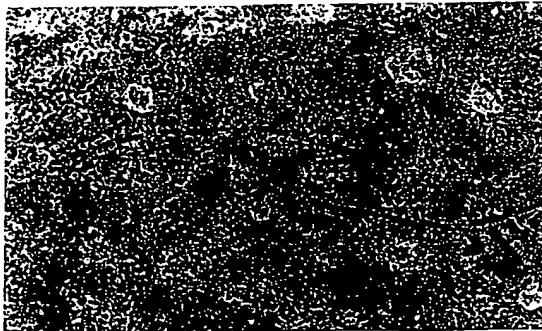
コントロール



cPA添加



LPA添加

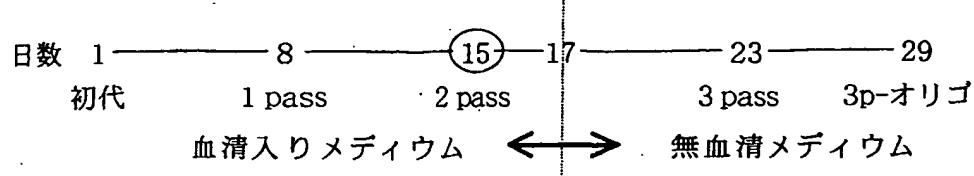


WO 02/083149

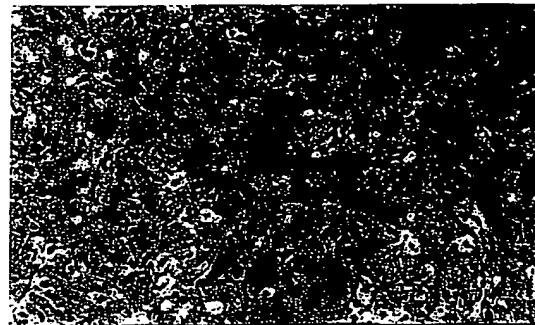
PCT/JP02/03659

図 8

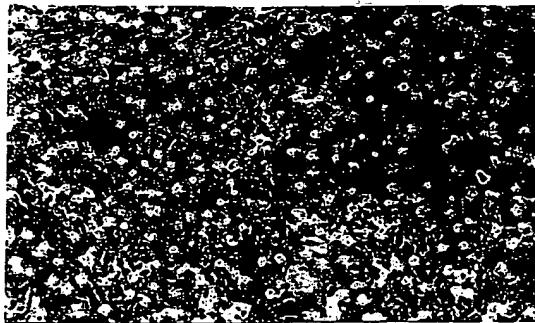
1P-6日目



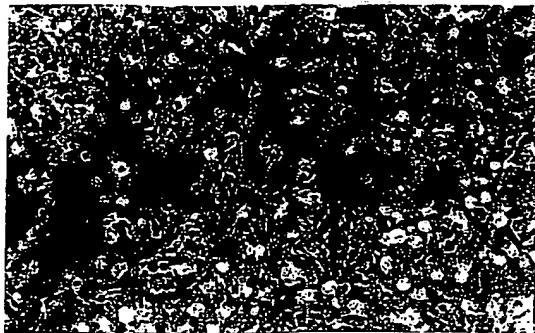
コントロール



cPA添加



LPA添加

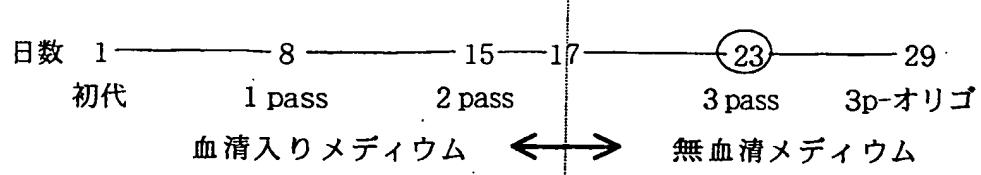


WO 02/083149

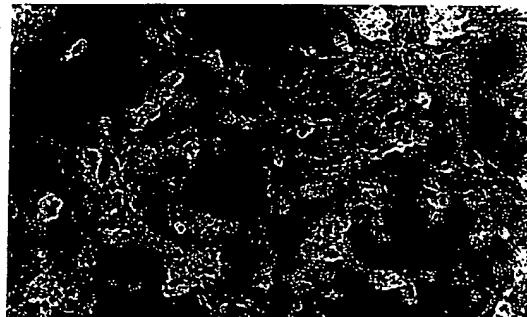
PCT/JP02/03659

図 9

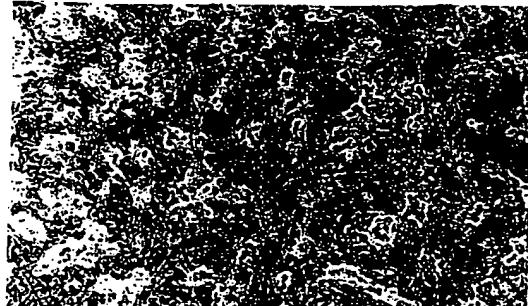
2P - 6 日目



コントロール



cPA添加



LPA添加

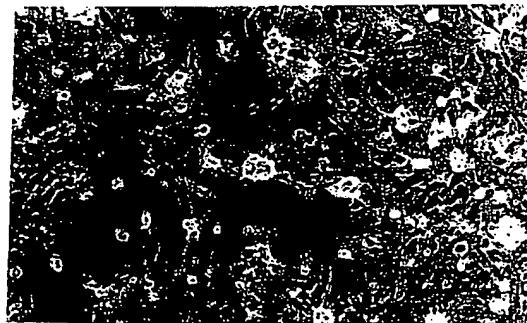
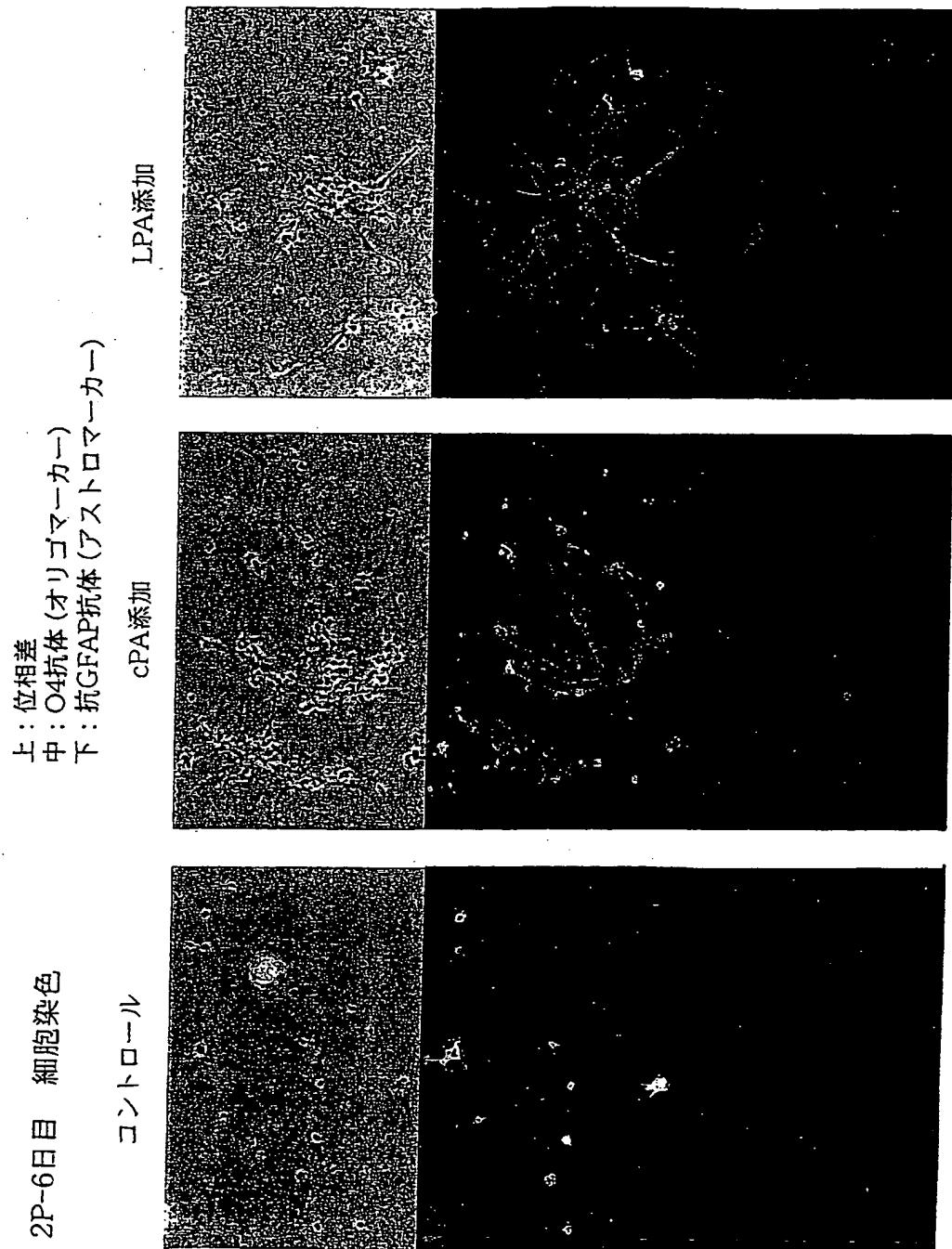


図 10

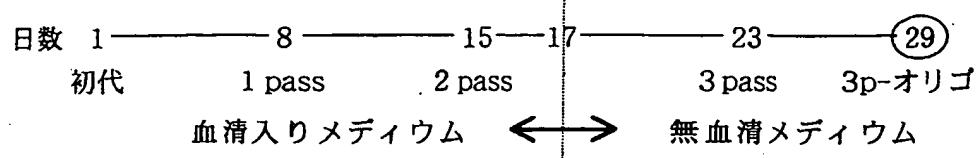


WO 02/083149

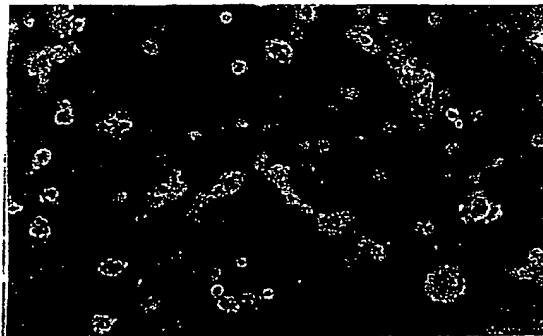
PCT/JP02/03659

図 11

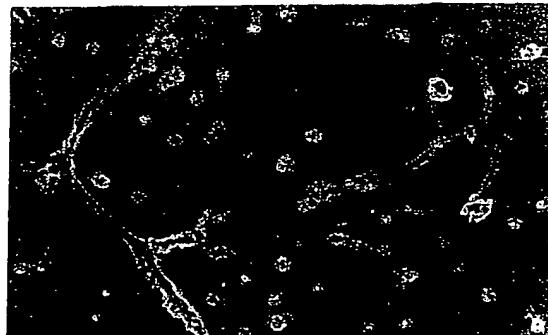
3P - Oligo



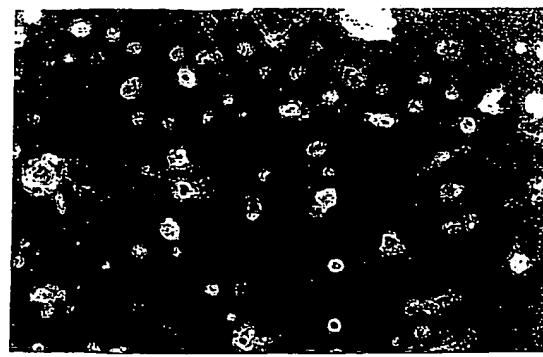
コントロール



cPA添加



LPA添加



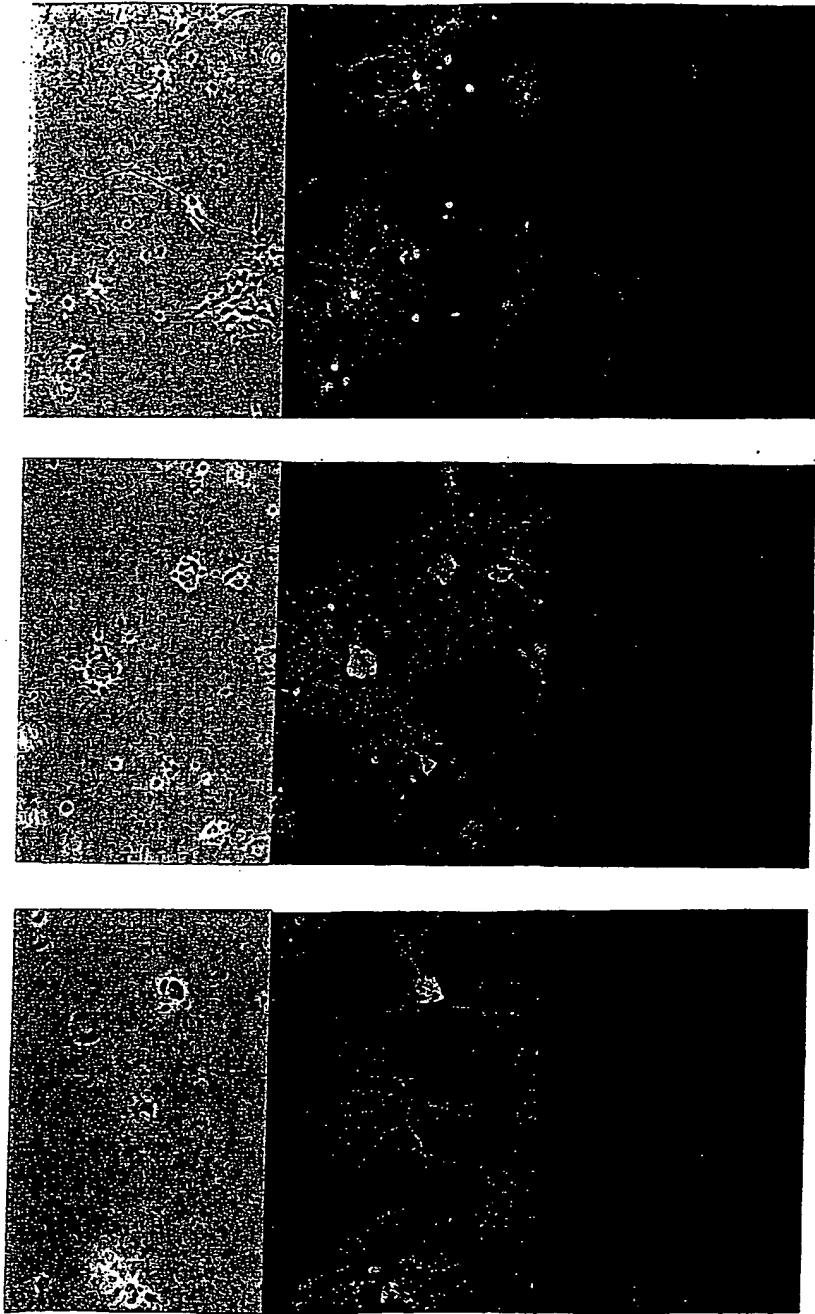
WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図 12

上：位相差
中：O4抗体（早期オリゴマーカー）
下：抗MBP抗体（後期オリゴマーカー）

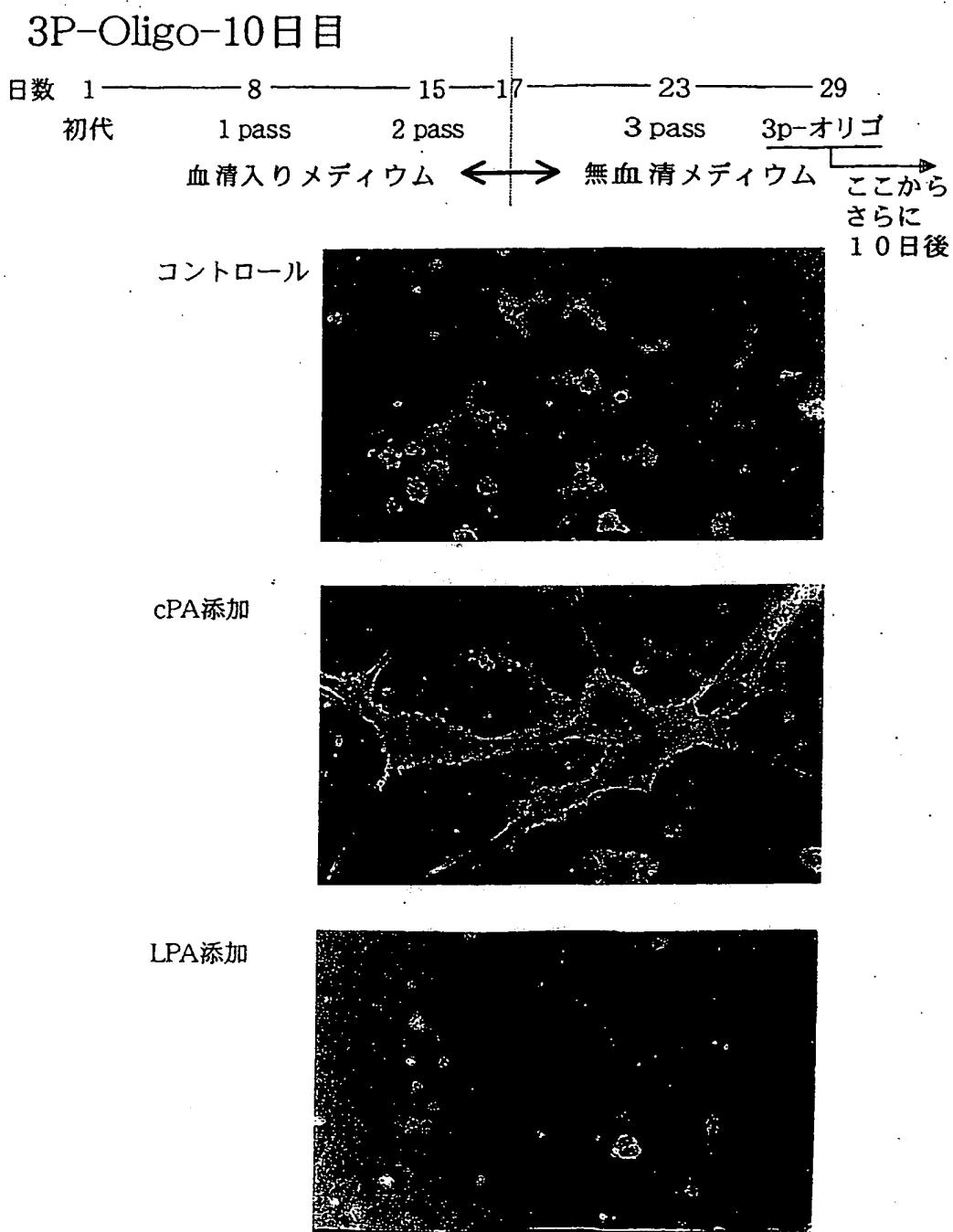
3P-Oligo 細胞染色
コントロール



WO 02/083149

PCT/JP02/03659

図 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTERInt.Cl⁷ A61K31/661, A61P25/00, 25/28, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/66-668, A61P25/00-36, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | US 6150345 A (Regents of The University of California), 21 November, 2000 (21.11.00), Particularly, refer to the compounds stated in example 1 & WO 00/9139 A2 | 1-5 |
| Y | WO 00/57865 A2 (Yeda Research and Development Co., Ltd.), 05 October, 2000 (05.10.00), Particularly, refer to compound iii stated in Claims 1 and 13 & AU 3451700 A | 1-5 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search 10 June, 2002 (10.06.02) | Date of mailing of the international search report 25 June, 2002 (25.06.02) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03659

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP 7-14977 A (Sagami Chemical Research Center), 13 June, 1995 (13.06.95), Particularly, page 6 (Family: none) | 1-5 |
| Y | WO 99/47101 A2 (LXR Biotechnology, Inc.), 23 September, 1999 (23.09.99), Particularly, refer to the compound expressed by general formula (XI) shown on p.14 of the description; page 43, line 33 to page 45, line 15 & EP 1069895 A2 | 1-5 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/03659

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K31/661, A61P25/00, 25/28, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K31/66-668, A61P25/00-36, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), CAOLD(STN), REGISTRY(STN), WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | US 6150345 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFOLNIA) 2000.11.21 特に、EXAMPLE 1 に記載の化合物等を参照。 &WO 00/9139 A2 | 1-5 |
| Y | WO 00/57865 A2 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 2000.10.05 特に請求の範囲1、及び、請求の範囲13に記載の化合物iii等を 参照。 &AU 3451700 A | 1-5 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

| | |
|--|--|
| 国際調査を完了した日 10.06.02 | 国際調査報告の発送日 25.06.02 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 上條のぶよ 4P 3040 電話番号 03-3581-1101 内線 3490 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/03659

| C(続き) . | 関連すると認められる文献 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| Y | JP 7-149772 A (財團法人相模中央化学研究所) 1995. 06. 13 特に第6頁等を参照。 (ファミリーなし) | 1-5 |
| Y | WO 99/47101 A2 (LXR BIOTECHNOLOGY, INC.) 1999. 09. 23 特に明細書第14頁に記載の一般式(XI)で表される化合物、及び、第43頁第33行～第45頁第15行等を参照。 &EP 1069895 A2 | 1-5 |